








Particles based on polyamino-acid(s) for use as carriers for active agents and their processes of preparation**Publication number:** FR2732218 (A1)**Publication date:** 1996-10-04**Inventor(s):** HUILLE SYLVAIN; LEMERCIER ALAIN; SOULA GERARD**Applicant(s):** FLAMEL TECH SA [FR]**Classification:****- International:** A23L1/29; A61K8/04; A61K8/30; A61K8/64; A61K9/16; A61K9/51; A61K47/42; A61Q19/00; A23L1/29; A61K8/04; A61K8/30; A61K9/16; A61K9/51; A61K47/42; A61Q19/00; (IPC1-7): A61K9/14; A61K47/42; C08G69/08**- European:** A61K8/04H; A61K8/88; A61K9/16H6D; A61K9/51; A61Q19/00**Application number:** FR19950003978 19950328**Priority number(s):** FR19950003978 19950328**Also published as:** FR2732218 (B1) EP0734720 (A1) EP0734720 (B1) ZA9602446 (A) US5904936 (A)

more >>

Cited documents: US4976968 (A) US4351337 (A)

Abstract not available for FR 2732218 (A1)

Abstract of corresponding document: **EP 0734720 (A1)**

Vector particles for the admin. of active agent(s) are based on polyamino acid(s) (PAA) and of average size >200 nm. Their PAA's comprise >= 2 types of recurrent amino acids NAA and IAA: NAA = hydrophobic neutral amino acid, and IAA = ionisable lateral chain amino acid; >= 1 part of the IAA type recurrent amino acids being in ionised form. The recurrent amino acids of each type may be the same or different and the mol.wt. of the PAA is >= 4000 Da (pref. >= 5000 Da).

Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication : **2 732 218**

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national : **95 03978**

⑤① Int Cl⁸ : A 61 K 9/14, 47/42, C 08 G 69/08

①②

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 28.03.95.

③① Priorité :

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 04.10.96 Bulletin 96/40.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥① Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *FLAMEL TECHNOLOGIES SOCIETE
ANONYME — FR.*

⑦② Inventeur(s) : *HUILLE SYLVAIN, LEMERCIER ALAIN
et SOULA GERARD.*

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : *BEAU DE LOMENIE.*

⑤④ **PARTICULES A BASE DE POLYAMINOACIDE(S) ET SUSCEPTIBLES D'ETRE UTILISEES COMME VECTEURS
DE PRINCIPE(S) ACTIF(S) ET LEURS PROCEDES DE PREPARATION.**

⑤⑦ La présente invention concerne les vecteurs utiles
pour l'administration de principes actifs (PA), de préférence
médicamenteux ou nutritionnels, notamment par voie orale
ou parentérale.

Le problème technique résolu par l'invention est celui
consistant en la fourniture de vecteurs formés par des (na-
no) ou (micro)particules à base de polyaminoacides, et qui
sont inertes vis-à-vis du PA (protéines), de granulométrie
contrôlable, résistantes et économiques.

Conformément à l'invention, les particules ont une taille
moyenne inférieure à 200 µm et sont constituées d'un poly-
aminoacide du type Leu/Glu, dans lequel Leu/Glu + Leu ≥
20% et la Mw ≥ 10 000 D.

FR 2 732 218 - A1



Le domaine de la présente invention est celui des vecteurs utiles pour l'administration de principes actifs (PA), de préférence médicamenteux ou nutritionnels, notamment par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale, parentérale, etc. Ces vecteurs permettent le transport sous protection des PA, à l'intérieur de l'organisme, jusqu'à leur site d'action. Ils visent à améliorer la biodisponibilité des PA. Ces vecteurs peuvent être, e. g., des systèmes à libération prolongée de PA.

Les PA plus particulièrement, mais non limitativement, concernés par l'invention sont, par exemple, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides.

La présente invention concerne, plus précisément, des particules - avantageusement de type submicroniques et/ou microniques - à base de polyaminoacides et destinées à être utilisées comme vecteurs de PA, en particulier médicamenteux. Ce sont donc des Particules de Vectorisation (PV), parmi lesquelles on distinguera, dans la suite du présent exposé, d'une part, des Nano Particules de Vectorisation (NPV) et, d'autre part, des MicroParticules de Vectorisation (MPV), selon une nomenclature propre à l'invention et qui sera définie infra.

La présente invention vise aussi bien les particules nues en tant que telles, que les systèmes de vecteurs de PA, constitués par les particules chargées par le (ou les) PA considéré(s).

L'invention concerne, également, un procédé de préparation desdites particules.

Les progrès du génie génétique et des biotechnologies, ainsi que les découvertes y afférentes d'outils génétiques, de protéines et de peptides biologiquement actifs, ont permis l'essor de nouveaux principes actifs médicamenteux (PA) offrant une activité intrinsèque et une sélectivité élevées. Ces PA sont, en revanche, facilement dégradés dans l'organisme avant d'atteindre leur site d'action thérapeutique et leur biodisponibilité est, en conséquence, très faible. Dans le cas de l'administration par la voie orale, le tractus gastro-intestinal constitue une barrière chimique et physique redoutable pour le PA qui doit, d'une part,

résister à la dégradation par le système digestif et, d'autre part, passer à travers la membrane épithéliale gastro-intestinale. A cet égard, on pourra, par exemple, se reporter à la revue de M. J. HUMPHREY (Delivery System for peptide Drugs, éditée par S. DAVIS et L. ILLUM, Plenum Press, N. Y., 1986), qui fait état de la

5 faible biodisponibilité des peptides et des peptides administrés par voie orale.

Naturellement, ces avatars de transport et de séjour dans l'organisme ne se limitent pas aux protéines, mais affectent également les PA formés par des outils génétiques (oligonucléotides, polynucléotides, plasmides) susceptibles d'être mis en oeuvre dans les techniques de thérapie génique.

10 Pour pallier cela, il a été proposé d'encapsuler les PA dans des particules de vectorisation de PA, dénommées également PV. L'intérêt de ces techniques d'encapsulation est de protéger et/ou de transporter le PA jusqu'à son site d'action thérapeutique, en le sauvegardant contre les agressions de l'organisme, afin d'augmenter sa biodisponibilité.

15 Parmi tous les matériaux envisageables pour l'encapsulation de PA, les polymères sont de plus en plus utilisés, du fait de leurs propriétés intrinsèques.

S'agissant du cahier des charges que l'on souhaite obtenir pour de telles PV, il est particulièrement exigeant et comprend, notamment, les spécifications suivantes.

20 1 - Il devrait, avantageusement, être possible de pouvoir disposer de PV de diamètre moyen compris entre une fraction de micron et quelques microns, avec une répartition granulométrique étroite, de façon à pouvoir adapter la granulométrie des PV au mode d'administration choisi et/ou le site thérapeutique visé. Par exemple, si une immunisation mucosale par la voie

25 orale est recherchée, la taille des PV doit être comprise entre 0,5 μm et 10 μm , afin que les PV puissent pénétrer les plaques de Peyer et atteindre les tissus lymphoïdes. Dans le cas d'une administration sous-cutanée, il y a avantage à disposer de PV de taille supérieure à 10 μm pour que les particules ne rentrent pas dans la circulation générale où elles sont rapidement

30 internalisées par le système réticulo-endothélial, mais qu'elles diffusent progressivement depuis leur site d'injection.

Cette spécification implique un contrôle dimensionnel des PV, à la fois sur la distribution de la granulométrie des PV et sur leur diamètre moyen, qui représente une opération très délicate sur le plan technologique.

- 2 - Il est souhaitable que les PV assurent la protection du PA jusqu'au site de libération. Par exemple, dans une administration orale d'un PA formé par un vaccin, ce dernier gagnerait à être protégé, tout au long du tractus gastrointestinal.
- 3 - Il est préférable que le polymère, constituant les PV, soit biocompatible et biodégradable et, encore mieux, qu'il soit métabolisé en produits non toxiques pour l'organisme.
- 4 - Il est également avantageux que le polymère, constitutif des PV, n'induisse pas de réponse immunitaire (immunogéniale).
- 5 - Enfin, il est également préférable que les PV puissent être obtenues par un procédé non dénaturant pour le PA. Ainsi, l'usage de solvants organiques et/ou de températures élevées est à proscrire.

De nombreuses propositions techniques antérieures ont vainement tenté de satisfaire à l'ensemble de ces spécifications. Les réponses apportées jusqu'alors ne sont donc que partielles et incomplètes.

Parmi ces propositions infructueuses, on peut citer celle selon le brevet US-A-5 286 495, qui concerne un procédé d'encapsulation de protéines en phase aqueuse, à l'aide de matériaux constitués d'alginate et de polylysine. Ce procédé est présenté comme non dénaturant pour les PA protéiniques, en raison du fait qu'il n'y est pas fait usage de solvant organique, de réactif chimique agressif ou de température élevée. Cependant, la technique de fabrication des PV, par vaporisation mise en oeuvre, ne permet pas de produire des particules de taille inférieure à 35 μm , ce qui ne permet pas leur internalisation par les cellules de l'organisme.

Par ailleurs, les techniques d'émulsion sont couramment utilisées pour préparer des microparticules de quelques microns.

Par exemple, les demandes de brevets WO 91/06 286 et WO 91/06 287 décrivent des procédés de formation de particules en émulsion dans lesquels on utilise, comme polymère :

- soit une protéine hydrophobe choisie parmi le collagène, la caséine, la kératine et, de préférence, les prolamines,
- soit un polymère biocompatible et biodégradable, tel que les poly(lactiques) ou les poly(orthoesters).

5 Le PA peut être hydrophobe ou hydrophile mais, dans ce dernier cas, la technique de double émulsion est recommandée. La taille des microparticules est d'environ 100 μm et, de préférence, comprise entre 50 nm et 100 μm .

La demande de brevet WO 89/08 449 fait également référence à l'encapsulation par émulsion, pour incorporer des PA dans des microparticules de poly(lactiques) de taille inférieure à 10 μm . Et il est précisé, dans ce document, que
10 cette taille est une limite maximale pour l'absorption au travers des tissus lymphoïdes des muqueuses (administrations orale, nasale, rectale, ophtalmologique).

Les techniques d'émulsion sont très séduisantes a priori, car elles permettent la mise en oeuvre de la plupart des PA dans des microparticules, dont on
15 peut contrôler la granulométrie jusqu'à des tailles de l'ordre de 1 μm . Mais, dans ces techniques, on a recours à des solvants organiques pour solubiliser les polymères constitutifs des particules. Ces solvants sont, e. g. des cétones, des alcools, des amides ou leurs mélanges. Et malheureusement, il s'avère que ces solvants peuvent être dénaturants, notamment pour les PA peptidiques ou polypeptidiques.

20 On connaît, également, des PV biocompatibles, formées en solution aqueuse sans élévation excessive de la température et appelées protéinoïdes. Ces PV ont été décrites dès 1970 par W. FOX et K. DOSE dans "Molecular Evolution and the origin of Life", Ed. Marcel DEKKER Inc. (1977).

En s'inspirant de ces travaux, la demande de brevet WO 88/01 213
25 ('1213) propose un système à délivrance de PA à base de protéinoïdes. Le polymère utilisé est un mélange de polypeptides artificiels obtenus par condensation thermique d'acides aminés synthétiques ou naturels et/ou de petites chaînes peptidiques. Le mode de condensation choisi conduit à des oligomères ramifiés et donc très peu solubles. Il est ensuite procédé à une sélection par filtration de ces oligomères
30 ramifiés, afin de récupérer les fractions hydrosolubles. Cette fraction est nécessairement composée de réticulats ramifiés de très petite masse. Les

microparticules selon cette invention sont obtenues par changement de pH qui crée la précipitation des oligomères ramifiés en protéinoïdes.

Lorsque la solution dans laquelle s'effectue la précipitation contient des PA en solution, une partie d'entre eux est entraînée dans le protéinoïde lors de sa formation.

Les inconvénients de ce système sont :

- un faible taux d'encapsulation,
- un procédé de purification délicat,
- un enchaînement non régulier (non alpha peptidique) des aminoacides dû au mode de synthèse qui ne permet pas d'affirmer que les réactions de dégradation enzymatiques seront identiques à celles d'un alpha-polyaminoacide,
- enfin, l'utilisation d'un grand nombre d'acides aminés monomères différents, qui peut induire une réponse immunitaire.

La demande de brevet WO 93/25 589 porte sur l'amélioration du procédé de synthèse de protéinoïdes par condensation thermique d'acides aminés.

Les protéinoïdes sont, cette fois encore, formés d'oligomères ramifiés de faibles masses molaires, constitués d'enchaînements irréguliers d'acides aminés. Le caractère hydrosoluble de ces oligomères ramifiés est obtenu :

- d'une part, par l'utilisation de très faibles masses (entre 250 et 2 400), ce qui correspond à des enchaînements très courts de 2 à 20 aminoacides,
- d'autre part, par le choix des aminoacides de départ.

Comme précédemment, les protéinoïdes sont formés par précipitation déclenchée par abaissement du pH des oligomères ramifiés hydrosolubles. Lorsque cette précipitation a lieu en présence de PA hydrosolubles, une partie de ceux-ci est entraînée dans le protéinoïde lors de sa formation. Les taux d'encapsulation restent modestes : de 20 à 40 %. Par ailleurs, l'abaissement du pH peut être dommageable à certains PA.

En outre, le fait de devoir réaliser l'encapsulation à un pH particulier constitue une contrainte méthodologique gênante et limite l'utilisation de ces microparticules au pH de précipitation des protéinoïdes qui ne correspond pas nécessairement aux pH biologiques. Par exemple, le pH peut varier de 2 à 7,5 dans

le tractus gastro-intestinal.

On mentionnera également, pour mémoire, le brevet US 4 351 337 qui relève d'un domaine différent de celui de la vectorisation de PA propre à l'invention. Ce brevet divulgue des implants fixés et localisés à des endroits bien précis de l'organisme. De tels implants n'ont donc rien à voir avec des formes administrables e. g. per os ou par injection. Lesdits implants peuvent être, entre autres, des microcapsules sphériques de type matriciel ou à gangue, dont les dimensions sont de l'ordre de 400-800 μm (fig. 8-9) et donc bien supérieures aux dimensions de l'ordre de 0,5 μm et 10 μm requises pour que les microparticules soient internalisées par les cellules de l'organisme. Ces implants sont réalisés à partir de matériaux polymères du genre polyaminoacide (Leu/Glu notamment). Le formage de ces implants est effectué, e. g., à l'aide de solutions de polyaminoacides dans du dioxane, que l'on évapore in fine.

Dans cet état de connaissances, l'un des objectifs essentiels de la présente invention est de fournir des PV, en particulier submicroniques et microniques, à base de polyaminoacides et susceptibles de servir de vecteurs d'un principe actif (PA), en particulier médicamenteux et/ou nutritionnel, pour l'administration dudit PA à un organisme humain ou animal, ces PV satisfaisant pleinement au cahier des charges explicité supra et répété ci-après :

- 1 - Il devrait, avantageusement, être possible de pouvoir disposer de PV de diamètre moyen compris entre une fraction de micron et quelques microns, avec une répartition granulométrique étroite, de façon à pouvoir adapter la granulométrie des PV au mode d'administration choisi et/ou le site thérapeutique visé. Par exemple, si une immunisation mucosale par la voie orale est recherchée, la taille des PV doit être comprise entre 0,5 μm et 10 μm , afin que les PV puissent pénétrer les plaques de Peyer et atteindre les tissus lymphoïdes. Dans le cas d'une administration sous-cutanée, il y a avantage à disposer de PV de taille supérieure à 10 μm pour que les particules ne rentrent pas dans la circulation générale où elles sont rapidement internalisées par le système réticulo-endothélial, mais qu'elles diffusent progressivement depuis leur site d'injection.

Cette spécification implique un contrôle dimensionnel des PV, à la fois sur la distribution de la granulométrie des PV et sur leur diamètre moyen, qui représente une opération très délicate sur le plan technologique.

- 2 - Il est souhaitable que les PV assurent la protection du PA jusqu'au site de libération. Par exemple, dans une administration orale d'un PA formé par un vaccin, ce dernier gagnerait à être protégé, tout au long du tractus gastrointestinal.
- 3 - Il est préférable que le polymère, constituant les PV, soit biocompatible et biodégradable et, encore mieux, qu'il soit métabolisé en produits non toxiques pour l'organisme.
- 4 - Il est également avantageux que le polymère, constitutif des PV, n'induisse pas de réponse immunitaire (immunogéniale).
- 5 - Enfin, il est également préférable que les PV puissent être obtenues par un procédé non dénaturant pour le PA. Ainsi, l'usage de solvants organiques et/ou de températures élevées est à proscrire.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des PV à base de polyaminoacides qui soient d'une granulométrie moyenne contrôlable et ajustable, et ce, dans des ordres de grandeur variant de 200 μm (MPV) jusqu'à quelques nanomètres (NPV).

- 20 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des PV qui soient simples à préparer (pH non agressif), stables à tout pH compris entre 4 et 13 et non immunogènes.

- 25 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des PV à base de polyaminoacides qui soient faisables industriellement et économiques et qui soient aptes à se charger en PA avec des forts taux de chargement.

- 30 Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un procédé de préparation de MPV et/ou de NPV à base polyaminoacides et susceptibles d'être utilisées comme vecteurs de PA, ledit procédé se devant d'être économique, simple à mettre en oeuvre, non dénaturant pour les PA et devant, en outre, permettre une maîtrise fine de la granulométrie moyenne des particules obtenues (maximum 200 μm).

Un autre objectif essentiel de l'invention est l'utilisation des susdites particules pour la préparation de médicaments (e. g. vaccins) et/ou de nutriments, en particulier pour administration *per os*, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale, de principes actifs, tels que des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir un médicament du type système à libération prolongée de PA, qui soit biocompatible et qui procure une haute biodisponibilité du PA.

Les objectifs relatifs aux produits, parmi d'autres, sont atteints par la présente invention qui concerne des particules de vectorisation de principe(s) actif(s), du type de celles à base de polyaminoacide(s) et de taille moyenne inférieure à 200 μm , caractérisées :

- 15 - en ce que leurs polyaminoacides constitutifs comprennent au moins deux types d'acides aminés récurrents AAN et AAI :
 - le type AAN correspondant à un acide aminé neutre hydrophobe,
 - et le type AAI correspondant à un acide aminé à chaîne latérale ionisable, au moins une partie des
- 20 aminoacides récurrents de type AAI étant sous forme ionisée,
 - les aminoacides récurrents de chaque type, AAN et AAI, étant identiques ou différents entre eux,
- 25 - en ce que le rapport molaire $\text{AAN/AAI} + \text{AAN} \geq 20 \%$, de préférence $\geq 25 \%$,
- et en ce que la masse molaire en poids M_w des polyaminoacides est supérieure ou égale à 10 000 D, de préférence comprise entre 20 000 D et 500 000 D et, plus
- 30 préférentiellement encore, comprise entre 50 000 et 500 000 D.

Il est du mérite de la Demanderesse d'avoir procédé à une sélection parmi les polyaminoacides, pour ne retenir que ceux ayant pour trait d'être non hydrosolubles, formant des suspensions colloïdales stables dans un large domaine de pH compatibles avec le pH des milieux physiologiques pour les applications visées et comportant un premier type de monomères AAN formé par un acide aminé neutre hydrophobe et au moins un deuxième type de monomères formé par un acide aminé AAI, caractérisé par une chaîne latérale de fonctionnalité carboxyle (Glu, Asp), ionisable à des pH physiologiques non dénaturants pour les protéines.

Selon une caractéristique de l'invention, ces polyaminoacides (PAA) sont linéaires et, plus préférentiellement encore, présentent des enchaînements α -peptidiques.

Selon une autre caractéristique de l'invention, la masse des polyaminoacides sélectionnés est élevée.

Ces polyaminoacides, de préférence polyaminoacides, forment des polymères amphiphiles pouvant interagir, à la fois avec des substances hydrophobes et des substances hydrophiles, ce qui leur confère des propriétés remarquables comme tensioactifs ou comme dispersants. Mais, en plus de leurs propriétés amphiphiles, ces polyaminoacides se distinguent par une propriété nouvelle et tout à fait inattendue, les chaînes de polyaminoacides en solution aqueuse s'associent spontanément et forment des particules qui peuvent s'associer avec des protéines. En pratique, ces particules forment, de préférence, des matrices au sein desquelles sont dispersés le (ou les) PA. La structure linéaire préférée par enchaînements α -peptidiques et la masse molaire élevée sont aussi des caractéristiques importantes de ces polyaminoacides.

Ces PAA non hydrosolubles se distinguent par une propriété nouvelle et tout à fait inattendue. Mis au contact d'une solution aqueuse, ils forment spontanément, dans celle-ci, une suspension colloïdale de nanoparticules (NPV) susceptibles de s'agréger en microparticules (MPV). En outre, des protéines en solution peuvent s'associer spontanément avec ces particules pour former des particules chargées de PA.

Cette découverte est d'autant plus surprenante que l'enseignement de la

demande WO 93/25 583 était plutôt de nature à inciter l'homme du métier à orienter ses recherches d'un matériau idéal pour l'"encapsulation" de protéines, vers d'autres produits que les polyaminoacides. En effet, les nombreux essais, réalisés et donnés dans la demande de brevet WO 93/25 583, laissent à penser que, parmi tous les polyaminoacides testés, seuls ceux sélectionnés et revendiqués conviennent. Ce n'est qu'au terme d'une démarche inventive que la Demanderesse a pu prouver qu'il n'était rien en proposant une autre sélection de polyaminoacides ayant un comportement différent de ceux selon le WO 93/25 583, ces PAA étant, en particulier :

- 10 - des PAA linéaires et de masses molaires élevées (supérieures à 10 000 D), plutôt que des petits oligomères ramifiés,
- des PAA insolubles, plutôt que solubles, et il est surprenant que ces PAA insolubles forment spontanément une suspension colloïdale de NPV et que des protéines s'associent spontanément à ces NPV.

15 Les polyaminoacides préférés sont des polymères synthétiques linéaires, composés, avantageusement, d' α -aminoacides liés par des liaisons peptides. Il existe de nombreuses techniques synthétiques pour former des polymères à blocs ou statistiques, des polymères à chaînes multiples et des polymères contenant une séquence déterminée d'aminoacides (cf. Encyclopedia of Polymer Science and
20 Engineering, volume 12, page 786 ; John Wiley & Sons). De nombreux dérivés d'aminoacides et de peptides ont été utilisés comme monomères pour la préparation des polyaminoacides. Cependant, les monomères servant le plus couramment sont les anhydrides des N-carboxy- α -aminoacides dont la préparation est donnée, par exemple, dans Biopolymers, 15, 1869 (1976). Les techniques de polymérisation de
25 ces monomères sont connues de l'homme de l'art et sont détaillées dans l'ouvrage de H. R. KRICHELDORF "α-Aminoacid-N-Carboxy Anhydrides and Related Heterocycles" Springer Verlag (1987);

Les techniques de synthèses impliquent, généralement, de protéger les fonctions réactives des acides aminés à chaînes latérales ionisables, afin qu'elles
30 n'interfèrent pas lors de l'étape de polymérisation. Il s'ensuit qu'une étape de déprotection est nécessaire pour rétablir la fonctionnalité des chaînes latérales

ionisables du polymère. On peut citer, par exemple, les procédés de déprotection par saponification des esters méthyliques (STAHMAN et coll ; J. Biol. Chem., 197, 771 (1952) ; KYOWA HAKKO, FR 2 152 582) ou de débenzylation [BLOUT et coll. ; J. Amer. Chem. Soc., 80, 4631 (1958)].

5 Avantageusement, les PV ont une concentration moyenne en polyaminoacide variant de 0,01 % à 15 % poids sec, de préférence de 0,05 à 5 % poids sec.

 Selon un mode préféré de réalisation des particules selon l'invention, l'AAN (ou les AAN) est(sont) choisi(s) dans la liste suivante : Leu - Ile - Val - Ala -
10 Pro - Phe - et leurs mélanges et l'AAI (ou les AAI) est (sont) formé(s) par le Glu et/ou l'Asp.

 De manière plus préférée encore, les particules de l'invention sont caractérisées en ce que leurs polyaminoacides constitutifs comportent un seul type de monomères AAI correspondant, de préférence, à Glu et un seul type de
15 monomères correspondant, de préférence, à Leu.

 Le fait de limiter le nombre de comonomères à deux seulement : un de type AAN et un de type AAI, permet de minimiser l'immunogénicité des particules. Il s'agit là d'un avantage notable de cette forme préférée de réalisation de l'invention.

20 La taille des particules de polyaminoacides sélectionnés fait partie des éléments fondamentaux de la présente invention. Avantageusement, ces particules ont une taille moyenne comprise entre 0,01 et 200 μm , avec une répartition granulométrique étroite.

 L'un des atouts de l'invention est d'être parvenue à un très bon contrôle
25 de la granulométrie moyenne des particules et de leur répartition granulométrique. Ce contrôle passe par l'atteinte de tailles de particules extrêmement réduites, de l'ordre de quelques nanomètres et de très faible polydispersité, sachant qu'il est possible d'augmenter la taille de ces nanoparticules par aggrégation. Sans que cela ne soit limitatif, on peut ainsi distinguer deux populations de particules en fonction de
30 leurs tailles.

 La première de ces populations regroupe les particules de type NPV

nanoparticules, de taille moyenne comprise entre 0,01 μm et 0,5 μm , de préférence entre 0,03 et 0,4 μm .

La deuxième population comprend les particules de type MPV, de taille moyenne supérieure à 0,5 μm , de préférence inférieure ou égale à 20 μm .

5 Au sens de l'invention, on entend, par taille ou granulométrie moyenne, la moyenne arithmétique des diamètres en volume (D4,3) établis par diffraction laser dans le cas des MPV, et le diamètre de gyration mesuré par diffusion élastique de la lumière dans le cas des NPV.

10 Les *microparticules* MPV sont, avantageusement, obtenues à partir des *nanoparticules* NPV, e. g. par agrégation.

Selon une variante, les *microparticules* comprennent au moins un agent d'agrégation.

Conformément à une caractéristique préférée de l'invention, les particules comprennent au moins un principe actif.

15 Le contrôle de la taille des MPV et NPV s'opère, également, par l'intermédiaire de la composition des polyaminoacides mais aussi, pour une même composition, de la structure ordonnée (séquentielle alternée S_1) ou désordonnée (séquentielle aléatoire S_2).

20 La nomenclature qui sera utilisée, dans le présent exposé, pour nommer les polyaminoacides est la suivante : poly AAN1/AAN2/.../AAI1/AAI2/...-A/B/C/D..., A, B, C, D... étant les pourcentages molaires des acides aminés. De plus, on distingue la structure ordonnée en blocs de la structure désordonnée ou statistique en ajoutant le terme "blocs". Par exemple, le copolymère statistique composé de 30 % de leucine et de 70 % d'acide glutamique est le poly Leu/Glu-30/70 et le copolymère avec la même composition et de structure blocs (Leu)_n-(Glu)_m est le poly Leu/Glu blocs-30/70.

Suivant un mode préféré de réalisation de l'invention, les particules sont caractérisées en ce que AAI = Glu et AAN = Leu.

30 Outre les particules décrites supra à titre de produit nouveau *per se*, la présente invention a également pour objet un procédé de préparation de particules à base de polyaminoacide(s) et susceptibles d'être utilisées comme vecteurs de

principe(s) actif(s), caractérisé :

- en ce que l'on met en oeuvre des polyaminoacides :

▲ comprenant au moins deux types d'acides aminés récurrents AAN et AAI :

5 . le type AAN correspondant à un acide aminé neutre hydrophobe,

. et le type AAI correspondant à un acide aminé à chaîne latérale ionisable,

10 ▲ la masse molaire en poids M_w du (ou des) polyaminoacide(s) étant supérieure ou égale à 10 000 D, de préférence comprise entre 20 000 et 500 000 D et, plus préférentiellement encore, étant comprise entre 50 000 et 200 000 D, les acides aminés récurrents de chaque type AAN et AAI étant
15 identiques ou différents entre eux,

▲ le rapport molaire AAN/AAI + AAN étant $\geq 20 \%$, de préférence $\geq 25 \%$,

- en ce que l'on réalise une dispersion de ces polyaminoacides dans un liquide, de préférence dans une solution aqueuse saline, dont on a ajusté le pH à une valeur choisie de telle
20 sorte qu'au moins une partie des acides aminés de type AAI soit sous forme ionisée,

- et en ce que l'on recueille ainsi une solution colloïdale de particules.

25 Ce procédé est l'un de ceux permettant d'obtenir les particules NPV présentées ci-avant. Ces particules peuvent donc être celles dans lesquelles l'AAN (ou les AAN) est(sont) choisi(s) dans la liste suivante : Leu - Ile - Val - Ala - Pro - Phe - et leurs mélanges et celles dans lesquelles l-AAI (ou les AAI) est(sont) formé(s) par le Glu et/ou l'Asp.

30 La formation des NPV se produit donc de manière simple, dans une solution aqueuse saline (par exemple) et à un pH choisi de telle sorte qu'au moins

une partie des monomères AAI (de nature identique ou différente entre eux) soit sous forme ionisée. Cette génération spontanée de nanoparticules, par dispersion de copolyaminoacides en milieu salin, est remarquable de simplicité, d'économie et donc de faisabilité industrielle.

- 5 De plus, il est possible, par cette méthode, d'éviter les solvants organiques, généralement utilisés pour préparer ce type de particules et qui sont connus pour entraîner la dénaturation des protéines.

Les conditions d'obtention de ces NPV sont aisément maîtrisables par l'homme du métier.

- 10 La formation de NPV dépend, d'une part, de la nature de la solution aqueuse de dispersion et, d'autre part, des caractéristiques du polyaminoacide.

- Les solutions aqueuses de dispersion des polyaminoacides doivent satisfaire certaines conditions de pH et de force ionique. On conçoit, en effet, facilement que la stabilité des nanoparticules de polymères, contenant des groupements ionisés, dépend de la force ionique. Quant au pH, il est bien sûr fonction de la nature des groupements ionisables, dont il fixe la fraction f d'ionisation. Ainsi, pour des groupements carboxyliques, f croît avec le pH.
- 15

- En tout état de cause, l'un des avantages certains du procédé selon l'invention est de permettre la formation spontanée des NPV indépendamment du pH, dans un domaine étendu de pH compris entre 4 et 13, ce qui couvre largement le domaine des pH biologiques et ouvre ainsi un large champ d'applications.
- 20

Les NPV de polyaminoacides forment des solutions colloïdales.

Pour ces polyaminoacides, les caractéristiques discriminantes de la formation de NPV sont :

- 25 i) - la masse molaire,
ii) - la nature des acides aminés,
iii) - les proportions en acides aminés,
iiii) - la présence d'enchaînements linéaires, de préférence α -peptidiques.

Ces caractéristiques sont discutées ci-dessous.

- 30 Concernant l'influence de la masse molaire, on peut indiquer que la formation des NPV résulte de l'association, entre les chaînes, de polyaminoacides

et que celle-ci s'opère différemment suivant leur masse molaire.

Les polymères de masse molaire $\geq 10\,000$ D, de préférence comprise entre 20 000 et 500 000 D et, plus préférentiellement encore, comprise entre 50 000 et 200 000 D, se dispersent facilement en solution aqueuse et forment des suspensions colloïdales de NPV stables. Dans les mêmes conditions, les polymères de plus faible masse molaire ne forment pas de suspensions colloïdales stables, une partie des particules précipitent et les NPV, maintenues en dispersion, sont peu diffusantes. L'association des chaînes de polymères en NPV est donc d'autant plus favorable que la masse molaire des polyaminoacides est élevée.

Concernant l'influence de la nature des acides aminés et de leur proportion, on peut préciser que, dans le cas des poly Leu/Glu, la fraction en leucine doit être suffisamment élevée pour éviter que le polymère ne soit totalement soluble et assurer des interactions hydrophobes suffisantes pour que les chaînes de polymères s'associent en NPV. La concentration critique en leucine, en dessous de laquelle le polymère est soluble, est comprise entre 20 % et 30 %, par exemple.

Pour la mise en oeuvre de la préparation de NPV conformes à l'invention, on fixe, avantageusement, la molarité de la solution saline entre 10^{-4} et 1 M, de préférence 10^{-2} M à 0,5 M environ.

Suivant une autre modalité pratique de l'invention, on choisit les concentrations en polymère dans la solution exprimées en % poids/volume, supérieures ou égales à 10^{-2} , de préférence comprises entre 0,05 et 30 et, plus préférentiellement encore, entre 0,05 et 5.

Dans la mesure où l'une des applications les plus remarquables des particules et leur procédé d'obtention selon l'invention est le transport sous protection de principes actifs dans l'organisme humain ou animal, il est avantageux de prévoir, à cette fin, qu'au moins un principe actif soit dissous dans le milieu liquide de formation des particules.

Cette mise en solution du principe actif, en particulier protéique et polypeptidique, s'effectue, de préférence, avant introduction des polyaminoacides dans le milieu, de sorte que l'on obtienne, après cette introduction, une solution colloïdale de particules chargées en principe actif.

Sans vouloir être lié par la théorie, on peut supposer que l'interaction entre le PA et les polyaminoacides procède d'associations hydrophobes et électrostatiques.

En résumé, l'encapsulation selon l'invention consiste donc à :

- 5 - mettre en solution aqueuse le PA à encapsuler,
- et à disperser du polyaminoacide dans une solution aqueuse, puis à mélanger la suspension colloïdale de nanoparticules ainsi formée à la solution de PA, ou bien, et de façon préférée, à disperser directement du polyaminoacide dans la solution de PA, de manière à obtenir spontanément des nanoparticules chargées en PA.

10 Une des caractéristiques essentielles majeures de l'invention est que le phénomène d'association du (ou des) PA avec les particules est indépendant du pH.

Il a été vu ci-dessus que la dispersion du copolyaminoacide dans le milieu liquide, salin de préférence, constitue une étape clé du procédé de préparation de particules éventuellement chargées en PA selon l'invention. Le procédé selon
15 l'invention se singularise, également, en ce qu'il comprend au moins une étape supplémentaire d'agrégation des *nanoparticules* (NPV) en *microparticules* (MPV), de préférence à l'aide d'un sel et/ou d'un acide et/ou d'un polymère (avantageusement un polyélectrolyte).

Grâce à cette caractéristique du procédé de l'invention, il est possible
20 d'agréger des NPV de taille comprise entre 0,01 et 0,05 μm , en MPV de taille comprise entre 0,05 et 200 μm , de préférence entre 0,05 et 20 μm et, plus idéalement encore, entre 0,05 et 10 μm .

Cette agrégation doit être réalisée dans des conditions non dénaturantes pour le PA et la Demanderesse a trouvé que l'addition, notamment de sels ou
25 d'acides ou de polymères cationiques, entraîne l'agrégation des NPV en MPV.

L'addition de sels permet d'augmenter la force ionique du milieu et provoque l'agrégation des NPV en écrantant les répulsions électrostatiques entre les particules. De plus, le sel peut aussi agir comme agent de réticulation des fonctions carboxyliques des polyaminoacides présentes à la surface des particules et provoquer
30 ainsi leur agrégation par complexation de plusieurs acides carboxyliques sur le cation du sel. Dans ce cas, on choisira, de préférence, des sels polycationiques parmi ceux

formant des complexes avec les acides carboxyliques, tels que les sels de Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Al^{2+} , Al^{3+} et Cu^{2+} .

5 L'addition d'acides diminue la fraction f d'ionisation en neutralisant les fonctions carboxyliques des polyaminoacides et entraîne ainsi l'agrégation des NPV en MPV. La fraction d'ionisation à laquelle s'opère l'agrégation dépend de la composition du polyaminoacide $\text{AAN}/(\text{AAN} + \text{AAI})$. Elle est d'autant plus faible que la proportion en AAI est élevée. L'acide qui est additionné est, avantageusement, un acide fort de pKa inférieur à celui des fonctions carboxyliques dans les polyaminoacides.

10 Les polymères cationiques agissent comme des agents d'agrégation en associant les NPV : ils forment des complexes entre les fonctions carboxyliques à la surface des particules qui sont ainsi reliées entre elles par les molécules de polymères cationiques.

15 Les conditions d'agrégation des NPV en MPV sont développées dans les exemples.

En fin de procédé, avec ou sans encapsulation de PA, on récupère les (nano) et les (micro)particules par tout moyen connu en soi et approprié. En pratique on peut, par exemple, faire usage de la centrifugation et la lyophilisation.

20 Le principe actif, susceptible d'être inclus ou incorporé (de préférence selon une configuration de type matrice) dans les particules selon l'invention, obtenues ou non par le procédé décrit supra, est médicamenteux et/ou nutritionnel. Il est, de préférence, choisi parmi :

- 25 ▲ les protéines et/ou les peptides parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, la calatonine, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, le facteur IX, l'interleukine ou leurs mélanges,
- 30 ▲ les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée,
- ▲ les acides nucléiques et, préférentiellement, les oligonucléotides

d'ARN et/ou d'ADN,

▲ et leurs mélanges.

A titre d'exemple de produit nutritionnel, on peut citer les vitamines, les acides aminés et les oligoéléments.

5 Selon un autre de ses aspects, l'invention vise également l'utilisation de ces NPV et MPV chargées en PA, pour la fabrication de médicaments du type systèmes à libération contrôlée de PA.

La présente invention concerne, enfin, les médicaments et les spécialités pharmaceutiques comprenant les PV chargées en PA et définies ci-dessus.

10 Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention dans ses différents aspects produit/procédé/application. Ces exemples illustrent la préparation de particules de polyaminoacides chargés ou non en principes actifs, de même qu'ils présentent les caractéristique de structure et les propriétés de ces particules.

15

EXEMPLES

I - PRÉPARATION DES POLYAMINOACIDES TESTÉS.

20 Les polymères mis en oeuvre dans les exemples sont des copolymères synthétiques linéaires, de structures en blocs ou statistiques, à base de leucine et d'acide glutamique. Leur masse molaire moyenne en poids Mw, déterminée par diffusion élastique de la lumière dans le solvant trifluoroacétique, est comprise entre 50 000 D et 150 000D. Les polyaminoacides ont des masses molaires en poids Mw,
25 déterminées par diffusion élastique de la lumière dans le solvant acide trifluoroacétique, comprise entre 50 000 D et 150 000 D.

Ces polymères sont obtenus à partir du copolymère de leucine et de glutamate de méthyle dont on rétablit la fonctionnalité des chaînes latérales ionisables du glutamate de sodium, en utilisant les procédés de déprotection connus des esters méthyliques
30 décrits, par exemple, par STAHPMAN et coll., J. Biol. Chem., 197, 771 (1952) ou dans le brevet KYOWA HAKKO, FR 2 152 582.

Le copolymère de leucine et de glutamate de méthyle est obtenu à partir des anhydrides des N-carboxy- α -aminoacides (NCA) de leucine et de glutamate de méthyle, dont la préparation est donnée par exemple dans Biopolymers, 15, 1869 (1976). Les techniques utilisées, pour la polymérisation des NCA en polymères de structures en blocs ou statistiques sont connues de l'homme de l'art et sont détaillées dans l'ouvrage de H. R. KRICHELDORF " α -aminoacides-N-Carboxy Anhydrides and Related Heterocycles", Springer Verlag (1987).

II - FORMATION DE NANOPARTICULES DE POLYAMINOACIDES (NPV) AVEC OU SANS INCORPORATION DE PRINCIPES ACTIFS.

II.1 - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN AAN SUR LA FORMATION DE PARTICULES.

EXEMPLE 1 : FORMATION DE NANOPARTICULES DE POLY LEU/GLU-30/70, 50/50 ET 75/25.

100 mg de copolyaminoacides statistiques de leucine et de glutamate de sodium, de composition Leu/Glu = 30/70 et de masse molaire $M_w = 90\,000$ D, sont dispersés dans 100 ml d'une solution de chlorure de sodium de molarité 10^{-2} mol/l. Quel que soit le pH de la solution compris entre 4,5 et 12 que l'on peut ajuster par addition d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium, le polymère forme, spontanément, une dispersion colloïdale de nanoparticules. En milieu acide de pH inférieur à 4,5, qui correspond à une fraction d'ionisation f égale à 0,05, le polymère lyophilisé ne se disperse pas dans la solution et reste insoluble.

Le tableau 1 ci-dessous rassemble les observations réalisées dans les mêmes conditions de dispersion, avec les copolyaminoacides statistiques de leucine et de glutamate de sodium, de composition Leu/Glu = 50/50 et 75/25 et de masse molaire M_w égales, respectivement, à 150 000 D et 85 000 D.

TABLEAU 1

POLYAMINOACIDES	DOMAINE pH D'EXISTENCE DES NANOPARTICULES	FRACTION D'IONISATION f DE L'ACIDE GLUTAMIQUE
POLY LEU/GLU-30/70	[4,5-12]	> 0,05
POLY LEU/GLU-50/50	[4,7-12]	> 0,05
POLY LEU/GLU-75/25	[6,2-12]	> 0,30

EXEMPLE 2 : SOLUBILITÉ DU POLY Leu/Glu-18/82.

Cet exemple montre que les copolymères de leucine et de glutamate de sodium de composition Leu/Glu = 18/82 ne forment pas de nanoparticules, car ils sont totalement solubles dans l'eau, quel que soit le $\text{pH} \leq 4,5$.

10 mg de poly Leu/Glu-18/82 lyophilisé sont dispersés dans 0,5 ml d'une solution de chlorure de sodium de molarité 10^{-2} mol/l. Le polymère est totalement dissous et la solution est limpide.

Il ne se forme pas de nanoparticules.

EXEMPLE 3 : STABILITÉ DES SUSPENSIONS COLLOÏDALES DE POLY Leu/Glu.

100 mg des copolyaminoacides statistiques de leucine et de glutamate de sodium de composition Leu/Glu = 30/70, 50/50, 75/25 et de masse molaire M_w , égale, respectivement, à 90 000 D, 150 000 D et 85 000 D, sont dispersés dans 10 ml, 5 ml et 2 ml d'une solution d'hydroxyde de sodium de molarité 10^{-2} mol/l, formant ainsi des solutions de concentration 1 %, 2 % et 5 % p/v de chacun des polyaminoacides. Les dispersions sont ensuite laissées en test de stabilité à température ambiante (15-25 °C) pendant 4 mois. A l'issue de cette période, les nanoparticules n'ont pas décanté et la diffusivité des solutions n'a pas changé.

II.2 - INFLUENCE DE LA STRUCTURE NON ORDONNÉE OU DIBLOC DES POLAMINOACIDES.

Pour les polyaminoacides diblocs, les interactions hydrophobes et hydrophiles sont beaucoup plus favorables, car elles s'exercent entre des blocs d'acides aminés de leucine ou d'acide glutamique entre les chaînes de polyaminoacides. Le poly Leu/Glu dibloc-50/50 forme des nanoparticules.

EXEMPLE 4 : FORMATION DE NANOPARTICULES DE POLY Leu/Glu DIBLOC-50/50.

100 mg de copolyaminoacides statistiques de leucine et de glutamate de sodium, de composition Leu/Glu = 50/50 et de masse molaire $M_w = 20\,000\text{ D}$, sont dispersés dans 100 ml d'une solution de chlorure de sodium de molarité 10^{-2} mol/l . Quel que soit le pH de la solution, compris entre 3 et 12, que l'on peut ajuster par addition d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium, le polymère forme, spontanément, une dispersion colloïdale de nanoparticules. En milieu acide, de pH inférieur à 3, le polymère ne se disperse pas et reste insoluble.

II.3 - DIMENSIONS ET STRUCTURE DES NANOPARTICULES DE Poly Leu/Glu.

Les nanoparticules de polyaminoacides forment une solution colloïdale. Les mesures par diffusion statique ou quasi élastique de la lumière permettent de mesurer la taille et la densité de polymère dans les nanoparticules.

Le tableau 2 ci-dessous regroupe des mesures effectuées à partir des polyaminoacides statistiques de compositions Leu/Glu = 30/70, 50/50, 75/25 et de masses molaires M_w égales, respectivement, à 90 000 D, 150 000 D et 85 000 D, ainsi que du polyaminoacide dibloc de composition Leu/Glu = 50/50 et de masse molaire $M_w = 20\,000\text{ D}$. Pour ces mesures, les polymères sont dissous dans une solution de chlorure de sodium de molarité 10^{-2} mol/l et de pH = 7.

TABLEAU 2

POLYAMINOACIDES	DIMENSION EN NANOMETRE (nm)	POURCENTAGE EN POIDS (p/v) DE POLYMER DANS LES PARTICULES
Poly Leu/Glu-30/70	102	0,4
Poly Leu/Glu-50/50	86	3,6
Poly Leu/Glu-75/25	330	1,9
Poly Leu/Glu dibloc-50/50	163	4,1

- 5 Les dimensions des nanoparticules varient avec la composition des polyaminoacides. Pour une même composition, elles dépendent de la structure dibloc ou désordonnée des chaînes de polyaminoacides.
- De plus, les répartitions des diamètres des nanoparticules de polyaminoacides sont, d'après les analyses par diffusion quasi élastique de la lumière, monomodales et
- 15 resserrées autour de leur valeur moyenne. Les largeurs des distributions obtenues sont comparables ou inférieures à celle du polystyrène de polydispersité égale à 1,2. La concentration de polymère dans les nanoparticules est remarquablement faible et toujours inférieure à 5 % p/v. Elle dépend de la composition et de la structure dibloc ou désordonnée des polyaminoacides.
- 20 Par ailleurs, l'observation par microscopie électronique (TEM à coloration négative) montre que les nanoparticules ont une forme sphérique ou légèrement allongée.

II.4 - ASSOCIATION DES NANOPARTICULES AVEC LES PROTÉINES.

- 25 Le procédé d'encapsulation est décrit avec, pour protéines modèles, l'hémoglobine, les cytochromes C de coeur de cheval et de *Saccharomyces cerevisiae*, l'albumine bovine et l'ovalbumine. Leurs masses molaires sont comprises entre 12,5 kD et 66 kD.

L'association entre les nanoparticules de polymère et les protéines est mise en évidence par ultracentrifugation analytique. Les solutions de polymères et protéines sont centrifugées à grandes vitesses et l'avancement des fronts de sédimentation du polymère et des protéines est suivi par la mesure de la densité optique aux longueurs d'onde à 250 nm et à 410 nm.

L'association entre les protéines et les particules colloïdales est caractérisée par l'existence d'un front unique de sédimentation correspondant à la superposition des fronts de sédimentation aux deux longueurs d'onde. Dans le cas contraire, en absence d'association, les fronts de sédimentation de la protéine et des particules colloïdales sont distincts et ne se superposent pas.

EXEMPLE 5 : ASSOCIATION DU POLY Leu/Glu-30/70 AVEC LE CYTOCHROME C.

10 mg de cytochrome C sont dissous dans 100 ml d'une solution tampon de phosphate de sodium de pH égal à 7,2 et de molarité 0,01 mol/l. 100 mg de poly Leu/Glu 30/70, de masse molaire $M_w = 90\,000$ D, sont ensuite dispersés directement dans cette solution. La plupart du cytochrome C sédimente avec les particules colloïdales de polymère lors de la centrifugation. L'analyse de la densité optique des fronts de sédimentation montre que 80 % du cytochrome sont associés aux particules colloïdales.

EXEMPLE 6 : ASSOCIATION DU POLY Leu/Glu-50/50 AVEC LE CYTOCHROME C.

10 mg de cytochrome C sont dissous dans 100 ml d'une solution tampon de phosphate de sodium de pH égal à 7,2 et de molarité 0,01 mol/l. 200 mg de poly Leu/Glu-50/50, de masse molaire $M_w = 150\,000$ D, sont ensuite dispersés directement dans cette solution. La plupart du cytochrome C sédimente avec les particules colloïdales de polymère lors de la centrifugation. L'analyse de la densité optique des fronts de sédimentation montre que plus de 80 % du cytochrome sont

associés aux particules colloïdales.

EXEMPLE 7 : ASSOCIATION DU POLY Leu/Glu-30/70 AVEC L'HÉMOGLOBINE.

5 Dans cet exemple, la suspension colloïdale du polyaminoacides et de la protéine est préparée de deux façons différentes, à partir de la même solution tampon de l'exemple 4, mais en modifiant l'ordre de mise en solution.

- 1 - Le poly Leu/Glu-30/70, de masse molaire $M_w = 90\,000\text{ D}$, est dispersé dans la solution d'hémoglobine suivant les mêmes conditions que celles de l'exemple
- 10 4. L'analyse par ultracentrifugation de la suspension colloïdale montre l'association de l'hémoglobine et du polyaminoacides dans les nanoparticules.
- 2 - Le poly Leu/Glu-30/70, de masse molaire $M_w = 90\,000\text{ D}$, est dispersé dans la solution tampon ne contenant pas d'hémoglobine. La suspension colloïdale formée est ensuite mélangée avec la solution d'hémoglobine. Dans ce cas, une
- 15 fraction importante de l'hémoglobine, estimée à 80 %, n'est pas associée aux nanoparticules de polyaminoacides et l'analyse par ultracentrifugation montre deux fronts de sédimentation correspondant, respectivement, aux nanoparticules de polyaminoacides et à l'hémoglobine.

La première étape de mise en solution de la protéine, avant dispersion du

20 polyaminoacide, assure, dans le cas de l'hémoglobine, un meilleur rendement d'encapsulation.

EXEMPLE 8 : NANOPARTICULES DE POLY Leu/Glu-30/70 EN PRÉSENCE D'OVALBUMINE.

25

Le poly Leu/Glu-30/70, de masse molaire $M_w = 90\,000\text{ D}$, est dispersé dans une solution de chlorure de sodium dans les mêmes conditions que celles de l'exemple 2 avec, en plus, de l'ovalbumine. Les caractéristiques des particules colloïdales analysées par diffusion de la lumière sont identiques à celles formées en absence de

30 protéine. La protéine n'empêche donc pas l'association des polyaminoacides en nanoparticules et ceci pour des concentrations en protéine pouvant atteindre 20 % p/p

par rapport au polyaminoacide.

III - AGRÉGATION DES NANOPARTICULES.

5 III.1 - AGRÉGATION PAR ADDITION D'UN SEL.

EXEMPLE 9 : AGRÉGATION PAR ADDITION DE SULFATE D'AMMONIUM.

100 mg de poly Leu/Glu-30/70, de masse molaire $M_w = 90\,000$ D, sont dispersés
10 dans 200 ml de solution tampon d'acide citrique et de phosphate de sodium de
molarité 0,05 mol/l et de pH égal à 5. Une solution concentrée de sulfate
d'ammonium est additionnée lentement à la dispersion. Le volume versé est
suffisamment faible devant celui de la solution de dispersion, jusqu'à agrégation des
NPV en MPV. Les MPV ainsi obtenus ont un diamètre moyen égal à 8 μm .

15

III.2 - AGRÉGATION PAR ABAISSEMENT DE pH.

Les fonctions carboxyliques latérales des polyaminoacides dans les nanoparticules
sont partiellement ionisées. Leur neutralisation, par addition d'un acide, entraîne
20 l'agrégation des nanoparticules.

L'agrégation peut être réalisée avec les acides dont la constante de dissociation (PA)
est inférieure à celle des fonctions carboxyliques latérales des polyaminoacides.

EXEMPLE 10 : AGRÉGATION PAR ADDITION D'ACIDE CHLORHYDRIQUE.

25

Les polyaminoacides statistiques de composition Leu/Glu = 30/70, 50/50 et 75/25
et de masses molaires M_w , égales respectivement à 90 000 D, 150 000 D et
85 000 D, sont dispersés dans des solutions tampons d'acide citrique et de phosphate
de sodium de molarité 0,05 mol/l et de pH égal à 5. Les concentrations des
30 polyaminoacides sont de 0,01 % p/v pour les polyaminoacides de composition
Leu/Glu-30/70 et 50/50 et 0,005 % p/v pour celui de composition 75/25.

L'agrégation des nanoparticules en suspension colloïdale est réalisée par addition progressive d'une solution 0,1 mol/l d'acide chlorhydrique, jusqu'à agrégation des NPV en MPV. Les résultats des mesures de granulométrie des MPV sont regroupés dans le tableau 3 suivant.

5

TABLEAU 3

10	POLYAMINOACIDES	DIAMÈTRE MOYEN (μm)	DISTRIBUTION
	Poly Leu/Glu-30/70	20 μm	[2 ; 100] μm
	Poly Leu/Glu-50/50	6 μm	[2 ; 15] μm
	Poly Leu/Glu-75/25	3 μm	[0,5 ; 8] μm

III.3 - AGRÉGATION PAR COMPLEXATION AVEC UN POLYMÈRE CATIONIQUE.

15 EXEMPLE 11 : AGRÉGATION DES NANOPARTICULES DE POLY Leu/Glu-50/50 PAR COMPLEXATION AVEC LA POLY D,L-LYSINE.

Les fonctions carboxyliques latérales des polyaminoacides dans les nanoparticules sont partiellement ionisées. Leur complexation avec un polymère cationique, tel que la polyLysine, entraîne l'agrégation des nanoparticules.

20 10 mg de poly Leu/Glu-50/50, de masse molaire $M_w = 150\,000$ D, sont dispersés dans 100 ml d'une solution tampon de phosphate de sodium de molarité 0,01 mol/l et de pH égal à 6. L'addition de 15 mg de bromure d'hydrogène de poly D,L-Lysine, de masse molaire $M_w = 15\,000$ D, permet d'agréger les nanoparticules de polymère en microparticules. Le diamètre moyen des microparticules est compris
25 entre 10 et 20 μm en faisant varier le pH entre 2 et 9 par addition d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium.

REVENDECATIONS :

1 - Particules de vectorisation de principe(s) actif(s), du type de celles à base de polyaminoacide(s) et de taille moyenne inférieure à 200 μ m,

caractérisées :

- 5 - en ce que leurs polyaminoacides constitutifs comprennent au moins deux types d'acides aminés récurrents AAN et AAI :
- . le type AAN correspondant à un acide aminé neutre hydrophobe,
 - . et le type AAI correspondant à un acide aminé à chaîne latérale ionisable, au moins une partie des
- 10 aminoacides récurrents de type AAI étant sous forme ionisée,
- les aminoacides récurrents de chaque type AAN et AAI étant identiques ou différents entre eux,
- 15 - en ce que le ratio molaire AAN/AAI + AAN \geq 20 %, de préférence \geq 25 %;
- et en ce que la masse molaire en poids Mw des polyaminoacides est supérieure ou égale à 10 000 D, de préférence comprise entre 20 000 et 500 000 D et, plus
- 20 préférentiellement encore, comprise entre 50 000 et 200 000 D.

2 - Particules selon la revendication 1, caractérisées :

- en ce que l'AAN (ou les AAN) est(sont) choisi(s) dans la liste suivante : Leu - Ile - Val - Ala - Pro - Phe - et leurs
- 25 mélanges,
- et en ce que l'AAI (ou les AAI) est(sont) formé(s) par le Glu et/ou l'Asp.

3 - Particules selon la revendication 1 ou 2, caractérisées par une concentration moyenne en polyaminoacide variant de 0,01 à 15 % poids sec, de

30 préférence de 0,05 à 5 % poids sec.

4 - Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 3,

caractérisées en ce que ce sont des NanoParticules de Vectorisation (NPV) de taille moyenne comprise entre 0,01 et 0,5 μm , de préférence entre 0,03 et 0,4 μm .

5 - Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisées en ce que ce sont des MicroParticules de Vectorisation (MPV) de taille moyenne supérieure à 0,5 μm , de préférence inférieure ou égale à 20 μm .

6 - Particules selon la revendication 5, caractérisées en ce qu'elles sont obtenues à partir des particules selon la revendication 4.

7 - Particules selon la revendication 6, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un agent d'agrégation.

8 - Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisées en ce qu'elles comprennent au moins un principe actif.

9 - Procédé de préparation de particules à base de polyaminoacide(s) et susceptibles d'être utilisées comme vecteurs de principe(s) actif(s), caractérisé :

- en ce que l'on met en oeuvre des polyaminoacides :

▲ comprenant au moins deux types d'acides aminés récurrents AAN et AAI :

. le type AAN correspondant à un acide aminé neutre hydrophobe,

. et le type AAI correspondant à un acide aminé à chaîne latérale ionisable,

▲ la masse molaire en poids M_w du (ou des) polyaminoacide(s) étant supérieure ou égale à 10 000 D, de préférence comprise entre 20 000 et 500 000 D et, plus préférentiellement encore, étant comprise entre 50 000 et 200 000 D, les acides aminés récurrents de chaque type AAN et AAI étant identiques ou différents entre eux,

▲ le ratio molaire AAN/AAI + AAN étant $\geq 20 \%$, de préférence $\geq 25 \%$,

- en ce que l'on réalise une dispersion de ces polyaminoacides dans un liquide, de préférence dans une solution aqueuse

saline, dont on a ajusté le pH à une valeur choisie de telle sorte qu'au moins une partie des aminoacides de type AAI soit sous forme ionisée,

- 5 - et en ce que l'on recueille ainsi une solution colloïdale de particules.

10 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé :

- en ce que l'AAN (ou les AAN) est(sont) choisi(s) dans la liste suivante : Leu - Ile - Val - Ala - Pro - Phe - et leurs mélanges,
- 10 - et en ce que l'AAI (ou les AAI) est(sont) formé(s) par le Glu et/ou l'Asp.

11 - Procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisé en ce qu'au moins un principe actif est dissous dans le liquide, de préférence avant introduction des polyaminoacides dans le milieu, de sorte que l'on obtienne, après cette

15 introduction, une solution colloïdale de particules chargées en principe(s) actif(s).

12 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape supplémentaire d'agrégation des particules, à l'aide d'au moins un agent d'agrégation constitué, de préférence, par un sel et/ou un acide et/ou une base et/ou un polymère éventuellement ionique.

20 13 - Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'on choisit des concentrations en polymère dans la solution exprimées en % poids/volume, supérieures ou égales à 10^{-2} , de préférence comprises entre 0,05 et 30 et, plus préférentiellement encore, entre 0,05 et 5.

25 14 - Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et/ou obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, caractérisées en ce que le principe actif est médicamenteux et, de préférence, choisi parmi :

- ▲ les protéines et/ou les peptides parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les
- 30 cytochromes, les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, la calatonine, l'érythropoïétine, l'insuline, les

hormones de croissance, le facteur IX, l'interleukine ou leurs mélanges,

▲ les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée,

5 ▲ les acides nucléiques et, préférablement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN,

▲ et leurs mélanges.

10 15 - Particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 8 et/ou obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 13, caractérisées en ce que le principe actif est constitué par au moins un vaccin.

16 - Spécialité pharmaceutique pour administration, de préférence, par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale,

15 caractérisée en ce qu'elle comporte des particules selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, 15 et 16 et/ou obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 14.

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
Y	US-A-4 976 968 (STEINER) * colonne 1, ligne 1 - colonne 5, ligne 24 *	1,2,4-6, 8-11,14, 16
Y,D	US-A-4 351 337 (SIDMAN) * colonne 13, ligne 19 - colonne 21, ligne 22 * * revendications 1-4 *	1,2,4-6, 8-11,14, 16
A	PHARM. ACTA HELV., vol. 58, no. 7, 1983 CH, pages 196-209, J. KREUTER 'EVALUATION OF NANOPARTICLES AS DRUG-DELIVERY SYSTEMS I: PREPARATION METHODS' * page 205, alinéa 3.5.1 - page 206 *	7,12,13
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
		A61K
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
22 Décembre 1995		Benz, K
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'ensemble d'un ou de plusieurs revendications ou à une partie technique générale O : divulgation non écrite P : document intermédiaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant</p>		